

岩永洋の論文内容の要旨

主論文

A Large Deletion Involving the 5'-UTR in the Spastin Gene Caused Mild Phenotype of Autosomal Dominant Hereditary Spastic Paraplegia

(Spastin 遺伝子の 5'-UTR を含む Large deletion による軽症常染色体優性遺伝性痙性対麻痺)

Hiroshi Iwanaga, Akira Tsujino, Susumu Shirabe, Hiroto Eguchi, Naomi Fukushima, Norio Niikawa,

Koh-ichiro Yoshiura, Katsumi Eguchi

American Journal of Medical Genetics (in press)

長崎大学大学院医学研究科内科系専攻

(指導教授：江口 勝美 教授)

[緒言]

常染色体優性遺伝性痙性対麻痺(AD-HSP)は今までに 8 つの原因遺伝子が特定されている。なかでも第 2 番染色体短腕 2p22-p21 にある Spastin 遺伝子(SPG4)は AD-HSP の約半数(45%)を占めている。SPG4 は全 17 エクソン, ゲノム上で約 90kb にわたる遺伝子で 616 のアミノ酸をコードしている。この蛋白, Spastin は AAA (ATPase associated with various cellular activities) 蛋白の一種で微小管の homeostasis に関与している。これまでに SPG4 の変異は 100 を越える報告があるが何れも conventional PCR-based analysis によって発見されていた。一方, AD-HSP 家系の連鎖解析で第 2 番染色体短腕に連鎖を認めながら, SPG4 の変異を見つけ得なかった報告も散見されおり, SPG4 に発見困難な変異がある可能性や第 2 番染色体短腕に別の原因遺伝子がある可能性が考えられていた。

我々も直接シーケンスでは SPG4 に異常がなかった AD-HSP の 1 家系につき遺伝子診断を試みた。

[方法]

1 つの AD-HSP 家系 33 名中, 患者 6 名, 未発症の血縁者 11 名, 配偶者 3 名, 計 20 名を対象に, 長崎大学医学部ヒトゲノム遺伝子解析倫理委員会の承認後インフォームドコンセント得た上で検体の提供を受けた。

1. 通常の SPG4 患者と本家系患者の臨床型を発症年齢, 罹病期間, 歩行障害の程度, 腱

反射や病的反射，感覚障害等で比較した．

- 2．第 2 番と 14 番染色体でパラメトリック連鎖解析を行った．追加のマイクロサテライトマーカーでハプロタイプ解析を行った．
- 3．患者の genomic DNA で SPG4 の全 17 エクソンと隣接するイントロン並びに promoter 領域を直接シーケンスした．
- 4．患者のリンパ球より cDNA を合成し各々エクソン 1-17，1-6，5-11，10-17 を増幅するように RT-PCR を施行した．
- 5．同家系患者と正常者の genomic DNA を用い，*EcoRI* と *HindIII* で DNA を切断し， $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識された SPG4 に特異的プローブを使ってサザンブロッティングを行った．

[結果]

- 1．本家系患者は純粋型 HSP で，通常の SPG4 患者に比べ発症年齢が高く(平均 44 歳)，また，罹病期間平均 14 年(最長 42 年)で歩行不能になる例は無く比較的軽症だった．
- 2．パラメトリック連鎖解析では，第 2 番染色体短腕上の SPG4 より約 2cM の距離にあるマーカー D2S367 で最大 Lod スコア 3.86 だった．
- 3．同家系患者の genomic DNA を用いた全 17 エクソンとそれに隣接するイントロン並びに promoter 領域についての直接シーケンスでは SPG4 の異常は無かった．
- 4．RT-PCR では患者と正常対照より同じサイズの PCR 産物が得られた．
- 5．サザンブロッティングの結果，5'-UTR 近傍からの構造異常が疑われた．また，6 人の患者のうち 4 人にヘテロな SNP(-423C>A)を認めており，この SNP より下流の 5'-UTR からの reverse primer で PCR をかけたところこの SNP の C 側のアレルは増幅されず本家系患者の DNA の構造異常は 5'-UTR が発端だと推測した．この構造異常を含む部分を PCR で増幅し直接シーケンスしたところ 5'-UTR からイントロン 1 にかけて 2307bp の Large deletion を確認した．

[考察]

我々は本家系の患者で SPG4 の 5'-UTR からイントロン 1 にかけて 2307bp の deletion を確認した．この deletion は 5'-UTR からイントロン 1 の splicing donor site も含み，恐らく mRNA はスプライシング出来ずそのまま分解されてしまうか，翻訳自体が始まらず，変異アレルから蛋白合成されないと考えられる．SPG4 発症の一因として haploinsufficiency が考えられているが 5'-UTR を含む deletion による SPG4 は軽症なのかもしれない．

また，これまでの SPG4 異常を見出せなかった報告の中には今回我々が経験したような構造異常も有得るのではないかと思われた．